

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 11 DEC 2001

WIPO PCT



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1999/S009	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/03305	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 21/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 21/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12M1/12		
Anmelder AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlage.n
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  23/03/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  07.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Vermeulen, S  Tel. Nr. +49 89 2399 7520  



**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-25                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-38                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1-4                        ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/03305

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-23,32,34
	Nein: Ansprüche	24-31,33,35-38
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-38
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-38
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt

## VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt



**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: EP-A-0 371 783 (HITACHI LTD) 6. Juni 1990 (1990-06-06)
- D2: US-A-3 915 802 (KOMINEK LEO A) 28. Oktober 1975 (1975-10-28)
- D3: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 413 (C-0877), 22. Oktober 1991 (1991-10-22)
- D4: WO 00 46354 A (PROTEIN SCIENCES CORP) 10. August 2000 (2000-08-10)
- D5: WO 87 06610 A (ENDOTRONICS INC) 5. November 1987 (1987-11-05)
- D6: US-A-4 806 484 (PETROSSIAN ASHOT ET AL) 21. Februar 1989 (1989-02-21)

**NEUHEIT**

**Ansprüche 1-23, 32 und 34**

Der Gegenstand der obengenannten Ansprüche wird im Stand der Technik nirgendwo offenbart und ist dementsprechend neu bezüglich Art. 33(2) PCT.

**Ansprüche 24-31 und 33**

Ein Membranmodul wird beansprucht welches mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume umfaßt und zusätzlich mindestens ein Gaszufuhrmittel umfaßt. Die Flüssigkeit, mit der beide Räume gegebenenfalls durchströmt wird, kann an sich nicht als technisches Merkmal des Membranmoduls angesehen werden und wird somit nicht die Neuheit oder erfinderische Tätigkeit des Moduls bestimmen. Das im Anspruch 24 definierte Membranmodul sowie die in den abhängigen Ansprüchen 25-31 und 33 definierten zusätzlichen Merkmale sind deshalb im Hinblick auf die Offenbarungen der Dokumente **D1** (Abbildung 1-2 ; Seite 5, Zeile 42-55), **D2** (Abbildung 2 ; Spalte 2, Zeile 65 - Spalte 4, Zeile 15), **D3** (Zusammenfassung), **D5** (Abbildung 1 ; Seite 6, Zeile 5 - Seite 7, Zeile 24) und **D6** (Abbildung 1 ; Spalte 1, Zeile 50 - Spalte 2, Zeile 19) nicht neu und erfüllen damit nicht das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium.

**Ansprüche 35-38**

Ein Reaktionssystem wird beansprucht welches zwei Räume sowie mindestens ein zwischen beiden Räumen geschaltetes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul einen ausreichenden Gasaustausch gewährleistet. Das Merkmal "ausreichend" ist sehr breit und außerdem unklar. Jeder winzige Gasaustausch könnte bereits als "ausreichend" betrachtet werden, je nach den Beurteilungskriterien. Dementsprechend ist der Gegenstand der Ansprüche 35-38 im Hinblick auf die Offenbarungen der Dokumente **D1**, **D3**, **D5** und **D6** nicht neu und erfüllt damit nicht das in Artikel 33(2) PCT genannte Kriterium. Alle genannten Dokumenten weisen ein Reaktionssystem auf, das ein Membranmodul umfaßt und wobei das Membran implizit auch Gasaustausch ermöglicht.





**ERFINDERISCHE TÄTIGKEIT**

Ansprüche 1-23

Dokument **D3 (Zusammenfassung)**, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Reaktionssystem und Verfahren zur Kultivierung von Zellen, das sich vom Gegenstand des Anspruchs 1 der vorliegenden Anmeldung nur dadurch unterscheidet, daß in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen kein Gas eingetragen wird. Zwar ist der Gegenstand des Anspruchs 1 dementsprechend neu, für den Fachmann aber ergibt sich das Verfahren nach den Ansprüchen 1, 3 und 9-23 in naheliegender Weise aus den Offenbarungen der D3, und dementsprechend erfüllt es nicht das in Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium bezüglich der erfinderischen Tätigkeit. Die in den Ansprüchen 2 und 4-8 definierten zusätzlichen Merkmale des Verfahrens sind weiterhin bereits bekannt aus **D1** bzw. aus dem allgemeinen Stand der Technik, und können somit nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit beruhen.

Ansprüche 24-33 und 35-38

Im Hinblick auf die Lehre der Dokumente **D1, D2, D3, D5** und **D6** scheinen die obengenannten Ansprüche keine Merkmale zu enthalten die zu einem auf erfinderischer Tätigkeit beruhenden Gegenstand führen könnten.

Anspruch 34

Im Hinblick auf die obengenannten Einwände bezüglich Neuheit und erfinderischer Tätigkeit erfüllt auch der Gegenstand des Anspruchs 34 das im Artikel 33(3) PCT genannte Kriterium nicht.

**Zu Punkt VI**

**Bestimmte angeführte Unterlagen**

Das Dokument **D4**, das nach dem Anmeldedatum der vorliegenden Anmeldung veröffentlicht wurde, enthält Offenbarungen welche für die vorliegende Anmeldung relevant sein können.

Anmelde Nr. Patent Nr.	Veröffentlichungsdatum (Tag/Monat/Jahr)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Prioritätsdatum (zu Recht beansprucht) (Tag/Monat/Jahr)
PCT/US00/01568	10/08/00	21/01/00	05/02/99



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH  
Industriepark Höchst  
Patent- und Lizenzabteilung  
Geb. K 801  
65926 Frankfurt am Main  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

13 December 2001 (13.12.01)

Applicant's or agent's file reference

M10001PCT

## IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/DE00/03305

International filing date (day/month/year)

21 September 2000 (21.09.00)

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

MAHR, Klaus  
Am Dornbusch 30  
65239 Hochheim  
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

Additional applicant/inventor for the US only.

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Jocelyne REY-MILLET

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 15 May 2001 (15.05.01)	
International application No. PCT/DE00/03305	Applicant's or agent's file reference M10001PCT
International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)	Priority date (day/month/year) 21 September 1999 (21.09.99)
Applicant MÄRKL, Herbert	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 23 March 2001 (23.03.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kiwa Mpay Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

10/088,412

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

Applicant's or agent's file reference M10001PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/03305	International filing date (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)	Priority date (day/month/year) 21 September 1999 (21.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12M 1/12,		
Applicant AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 23 March 2001 (23.03.01)	Date of completion of this report 07 December 2001 (07.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.





1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

- 2. The amendments have resulted in the cancellation of:**

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

Form PCT/IPEA/409 (Box I) (January 1994)



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/03305

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

<u>Application No. Patent No.</u>	<u>Publication date (day/month/year)</u>	<u>Filing date (day/month/year)</u>	<u>Priority date (valid claim) (day/month/year)</u>
PCT/US 00 / 01568	10 August 2000 (10.08.2000)	21 January 2000 (21.01.2000)	05 February 1999 (05.02.1999)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

<u>Kind of non-written disclosure</u>	<u>Date of non-written disclosure (day/month/year)</u>	<u>Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)</u>



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 00/03305

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-23, 32, 34	YES
	Claims	24-31, 33, 35-38	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-38	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-38	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

- D1 = EP-A-0 371 783 (HITACHI LTD), 6 June 1990  
(1990-09-06);
- D2 = US-A-3 915 802 (KOMINEK LEO A),  
28 October 1975 (1975-10-28);
- D3 = PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, Vol. 015, No. 413  
(C-0877), 22 October 1991 (1991-10-22);
- D4 = WO-A-00/46354 (PROTEIN SCIENCES CORP),  
10 August 2000 (2000-08-10);
- D5 = WO-A-87/06610 (ENDOTRONICS INC),  
5 November 1987 (1987-11-05);
- D6 = US-A-4 806 484 (PETROSSIAN ASHOT ET AL.),  
21 February 1989 (1989-02-21).

NOVELTY

Claims 1-23, 32 and 34

The prior art does not mention the subject matter of the above claims, which thus is novel under PCT Article 33(2).

Claims 24-31 and 33

A membrane module is claimed that comprises at least two chambers separated by a membrane and additionally at least one gas supply means. The liquid *per se*, which optionally



flows through both chambers, cannot be seen as a technical feature of the membrane module and hence does not determine novelty or inventive step of the module. In view of the disclosures in document **D1** (Figures 1-2; page 5, lines 42-55), **D2** (Figure 2; column 2, line 65 to column 4, line 15), **D3** (abstract), **D5** (Figure 1; page 6, line 5 to page 7, line 24) and **D6** (Figure 1, column 1, line 50 to column 2, line 19), the membrane module defined in Claim 24 and the additional features defined in dependent Claims 25-31 and 33 are thus not novel and consequently do not satisfy the criterion in PCT Article 33(2).

#### Claims 35-38

A reaction system is claimed that comprises two chambers and at least one membrane module connected between the two chambers, the membrane module guaranteeing sufficient gas exchange. The feature "sufficient" is quite broad in addition to being unclear. Even the tiniest gas exchange could be considered "sufficient" depending upon the criteria used. Accordingly, in view of the disclosures in documents **D1**, **D3**, **D5** and **D6** the subject matter of Claims 35-38 is not novel and hence does not satisfy the criterion in PCT Article 33(2). All of the documents cited show a reaction system comprising a membrane module, the membrane implicitly also facilitating gas exchange.

### INVENTIVE STEP

#### Claims 1-23

Document **D3** (**abstract**) discloses a reaction system and process for cultivating cells that differs from the subject matter of Claim 1 of the present application only in that no gas is introduced into the culture liquid in the cell-cultivation chamber. Although the subject matter of Claim 1 is correspondingly novel, the process according to Claims 1, 3 and 9-23 is obvious to a person skilled in





the art from the disclosures in D3 and accordingly does not satisfy the criterion in PCT Article 33(3) regarding inventive step. Furthermore, the additional features defined in Claims 2 and 4-8 are already known from **D1** and from the general prior art and hence cannot involve and inventive step.

Claims 24-33 and 35-38

In view of the teaching of documents **D1**, **D2**, **D3** and **D6**, the above-mentioned claims appear to contain no features that could lead to a subject matter involving an inventive step.

Claim 34

In view of the above-mentioned objections regarding novelty and inventive step, the subject matter of Claim 34 does not satisfy the criterion mentioned in PCT Article 33(3).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 00/03305

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI .

Document **D4**, which was published after the application date of the present application, contains disclosures that could be relevant to the present application.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. März 2001 (29.03.2001)

PCT

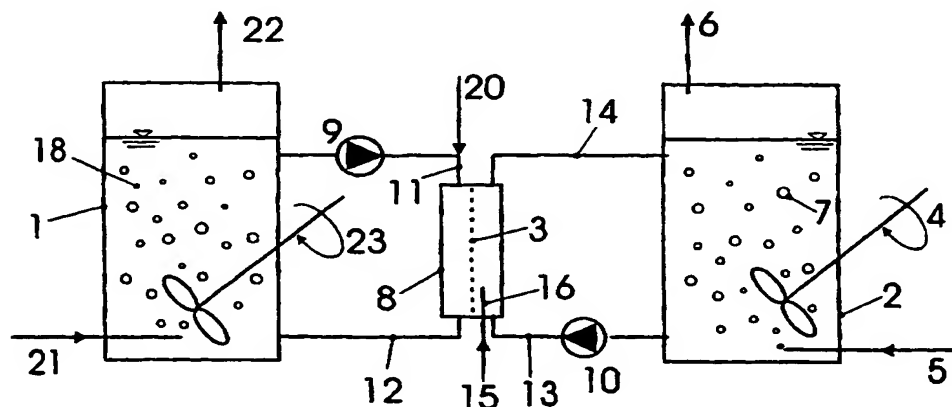
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/21759 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12M 3/00 (72) Erfinder; und  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/03305 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÄRKLE, Herbert  
(22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 2000 (21.09.2000) (DE/DE); Kleckener Kirchweg 27, D-21218 Seevetal  
(25) Einreichungssprache: Deutsch (DE).  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.  
(30) Angaben zur Priorität: 199 45 162.1 21. September 1999 (21.09.1999) DE (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [—/DE]; Brüningsstrasse 50, 65929 Frankfurt am Main (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING CELLS, A MEMBRANE MODULE, UTILIZATION OF A MEMBRANE MODULE AND REACTION SYSTEM FOR CULTIVATION OF SAID CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN, MEMBRANMODUL, VERWENDUNG EINES MEMBRANMODULS UND REAKTIONSSYSTEM ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for cultivating cells utilizing a reaction system, whereby the reaction system comprises a compartment for dialysis fluid, a compartment for cultivating cells and a membrane module connecting both compartments, whereby each membrane module has at least two compartments which are separated from each other by said membrane, one of said compartments being flooded by dialysis fluid while the other compartment is flooded by culture fluid containing cells. A first gas is introduced into said culture fluid in said compartment for cell cultivation and a second gas is introduced into said culture fluid in the membrane module. Said membrane is a functional dialysis membrane.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen und ein zweites Gas in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird, und die Membran funktional eine Dialysemembran ist.

WO 01/21759 A2



FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

- *Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

---

## **Verfahren zur Kultivierung von Zellen, Membranmodul, Verwendung eines Membranmoduls und Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen**

---

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen eingetragen wird. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Membranmodul, die Verwendung eines Membranmoduls und ein Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen.

Der Einsatz von Dialysemembranen im Zusammenhang mit der Kultur von Mikroorganismen bzw. von tierischen Zellen hat gewisse Vorteile in Bezug auf die erreichbaren Zelldichten bzw. der Konzentration der erhaltenen Produkte. Eine Zusammenfassung unterschiedlicher biotechnischer Produktionsverfahren, bei denen Membranen eingesetzt werden, wird von R. Pörtner und H. Märkl (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1998) 50:403-414) gegeben. Der wesentliche Effekt der Verwendung von Dialysemembranen beruht darauf, daß wachstumshemmende Stoffwechselprodukte der eingesetzten Organismen, die während des Wachstums bzw. während der Produktion entstehen, über eine Membran abgezogen werden. Der Transport wird hierbei durch eine Konzentrationsdifferenz der genannten Stoffwechselprodukte angetrieben. In der Europäischen Patentschrift EP 0 632 827 B1 sind ein Verfahren und eine Vorrichtung beschrieben, in der die technische Nutzbarmachung des Konzepts erläutert wird. Genauer gesagt wird ein Reaktionssystem beschrieben, das aus mindestens zwei Kammern besteht, die über mindestens eine Membran miteinander gekoppelt sind und bei dem die Kultur von Mikroorganismen oder pflanzlichen oder tierischen Zellen

sich in der einen Kammer befindet und die wachstumshemmenden Stoffwechselprodukte aus dieser Kammer in die Lösung der anderen Kammer gelangen.

Der dort beschriebene Einbau einer Dialysemembran direkt in den für die Kultur der Organismen vorgesehenen Raum ist im Labormaßstab (2-l-Maßstab) technisch gelöst (vergl. auch R. Pörtner und H. Märkl, aaO.). Das Scale-up dieser Technik in den Produktionsmaßstab bis zu mehreren m<sup>3</sup> beinhaltet jedoch Schwierigkeiten, die bis heute noch nicht beherrscht werden. Der Kern des Problems kann einfach erläutert werden. Es werden Membranen mit möglichst geringen Wandstärken (von wenigen µm bis zu 100 µm) angestrebt, da diese eine hohe Dialyseleistung besitzen. Diese Membranen verfügen jedoch nur über eine begrenzte mechanische Festigkeit. Die mechanische Belastung im Kulturraum ist jedoch bei schnell wachsenden aeroben Organismen sehr hoch, da es notwendig ist, große Mengen von Luft bzw. Sauerstoff für die Versorgung der Organismen einzutragen. Gleichzeitig müssen große Mengen von Kohlendioxid abtransportiert werden. Dieses bedingt einen hohen Energieeintrag durch Rühren in der Größenordnung von 10 kW/m<sup>3</sup>, wodurch die dünnen Membranen stark belastet werden.

In dieser Hinsicht wesentlich unproblematischer ist eine andere, ebenfalls bekannte Anordnung, wie sie in Fig. 1 dargestellt ist. Hier ist die Dialysemembran 3 in einem eigenen Membranmodul 8 außerhalb des Kulturraumes 2 untergebracht. Die Kulturflüssigkeit wird mit Hilfe einer Pumpe 10 durch das Membranmodul 8 gepumpt. Entsprechend wird das Membranmodul 8 über eine zweite Pumpe 9 mit Dialyseflüssigkeit aus dem Behälter 1 versorgt. Das Scale-up dieser Anordnung in den großen Produktionsmaßstab ist unproblematisch, da die Anordnung im wesentlichen aus drei voneinander unabhängigen Einheiten, zwei Behälter und einem Membranmodul, besteht, die unabhängig von einander dimensioniert werden können. Diese Anordnung hat jedoch, wie von Ogbonna, J. Ch. und Märkl, H.. (Biotechnology and Bioengineering, Vol. 41, S. 1092-1100 (1993)), am Beispiel dichter E.coli-Kulturen gezeigt wurde, den erheblichen Nachteil, daß ein Teil der Mikroorganismen für eine gewisse Zeit den Kulturraum 2 verläßt und während der Dialyse im Membranmodul 8 nicht mit Sauerstoff versorgt wird. Im zitierten Beispiel wird die Zeit, die ein bestimmter Organismus auf seinem Weg durch das Dialysemodul außerhalb des begasteten Kulturraumes verbringt, mit 11 Sekunden angegeben. Als Folge dieser sich wiederholenden zeitlich begrenzten Unterversorgung verringert sich die erreichbare Zelldichte auf einen Wert



von 110 g Trockengewicht/Liter. In einer allerdings nicht Scale-up-fähigen Anordnung mit in den Kulturraum integrierter Membran, also bei zeitlich ununterbrochener Sauerstoffversorgung, wird unter sonst gleichen Bedingungen eine Organismendichte von 160 g Trockengewicht/Liter erreicht.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das im Stand der Technik bekannte Reaktionssystem für die Kultivierung von Zellen nach Fig. 1, das mindestens einen Raum für die Kultivierung von Zellen (2), einen Behälter für Dialyseflüssigkeit (1) und ein dazwischengeschaltetes Membranmodul (8), durch das wachstumshemmende Stoffe aus der Kulturflüssigkeit in die Dialyseflüssigkeit gelangen, umfaßt, so weiter zu entwickeln, daß höhere Zelldichten erreicht werden.

Eine weitere Aufgabe bestand in der Bereitstellung eines zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Reaktionssystems.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen eingetragen wird und ein zweites Gas in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird.

Insbesondere wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen eingetragen wird und ein zweites Gas in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird, und die Membran funktional eine Dialysemembran ist.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß eine direkte Begasung der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit erfolgt, indem das zweite Gas direkt in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird.

In einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist vorgesehen, daß eine indirekte Begasung der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit erfolgt, indem das zweite Gas in die Dialyseflüssigkeit in dem Behälter für die Dialyseflüssigkeit eingetragen wird und von dort über die Membran des Membranmoduls in die im Membranmodul befindliche Kulturflüssigkeit gelangt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt neben der direkten Begasung gleichzeitig die indirekte Begasung.

In einer Ausführungsform umfaßt das Membranmodul mindestens ein Gaszufuhrmittel und führt das Gaszufuhrmittel das zweite Gas zu mindestens einem der durch die Membran getrennten, eine Flüssigkeit führenden Räume zu.

Dabei ist bevorzugt, daß das Gaszufuhrmittel eine Austrittsöffnung aufweist, die sich insbesondere in dem die Kulturflüssigkeit führenden Raum des Membranmoduls befindet.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Gaszufuhrmittel ein Röhrchen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Gaszufuhrmittel als Düse ausgebildet.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Membran des Membranmoduls aus einem Material besteht, das ausgewählt ist aus der Gruppe, die regenerierte Cellulose, Polyamid, Polypropylen und Polysulfon umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß das Membranmodul ein Plattenmodul ist.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wie auch des erfindungsgemäßen Membranmoduls ist vorgesehen, daß die Membran des Membranmoduls eine Dialysemembran ist.

Dabei ist besonders bevorzugt, daß das Material der Dialysemembran Cuprophan ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren sieht das Membranmodul bedingt durch sein Flächen-Volumen-Verhältnis und/oder seinen Permeabilitätskoeffizienten für das Gas einen für die Zellen ausreichenden Gasaustausch vor.

In einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, daß das Flächen-Volumen-Verhältnis mindestens etwa 5 m<sup>2</sup> pro Liter, insbesondere mindestens 10 m<sup>2</sup> pro Liter beträgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt das Flächen-Volumen-Verhältnis etwa 13 m<sup>2</sup> pro Liter beträgt.

In einer weiteren Ausführungsform beträgt der Sauerstoff-Permeabilitätskoeffizient etwa 0,066 cm pro Minute oder mehr.

In eine Ausführungsform kann vorgesehen sein, daß der Behälter für Dialyseflüssigkeit ein Mittel zum Zuführen von Gas und zum Abführen von Gas aufweist.

Weiterhin kann bei den erfindungsgemäßen Verfahren vorgesehen sein, daß das Membranmodul, der Raum für die Kultivierung der Zellen und/oder der Behälter für Dialyseflüssigkeit einen erhöhten Druck aufweist.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann vorgesehen sein, daß das erste und zweite Gas einzeln und unabhängig voneinander ausgewählt ist aus der Gruppe, die Luft, Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid und Mischungen davon umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das zweite Gas Sauerstoff.

In einer alternativen Ausführungsform ist das zweite Gas Kohlendioxid.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann vorgesehen sein, daß die Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die mikrobielle Zellen, Pilzzellen, tierische Zellen und pflanzliche Zellen umfaßt.

Ganz besonders bevorzugt ist, wenn die Zellen Zellen von *Escherichia coli* sind.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch ein Membranmodul welches mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume umfaßt und jeder Raum mit einer Flüssigkeit durchströmt wird, die Flüssigkeit in einem Raum Dialyseflüssigkeit und in dem anderen Raum Kulturflüssigkeit ist, und wobei das Membranmodul mindestens ein Gaszufuhrmittel umfaßt und das Gaszufuhrmittel in mindestens einem der durch die Membran getrennten Räume eine Austrittsöffnung aufweist.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Membran röhrenförmig ausgebildet ist und durch ihr Volumen einen der beiden Räume ausbildet.

Dabei kann weiterhin vorgesehen sein, daß der Durchmesser des durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raumes etwa 3 - 10 mm, bevorzugt 6 - 8 mm, beträgt.

In einer Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Membranmodul mehrere durch eine röhrenförmige Membran ausgebildete Räume.

In einer weiteren Ausführungsform befindet sich in mindestens einem der durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Räume eine Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels.

Dabei kann vorgesehen sein, daß sich die Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels in einem Raum außerhalb des/der durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raumes/Räume befindet.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Gaszufuhrmittel ein Röhrchen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Röhrchen konzentrisch in dem Raum angeordnet.

Bei dem erfindungsgemäßen Membranmodul kann vorgesehen sein, daß das Röhrchen einen Innendurchmesser von 0,2 mm bis 3 mm aufweist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels als Düse ausgebildet.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß auch durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Membranmoduls einem Verfahren nach der Erfindung gelöst.

Desweiteren wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung eines Membranmoduls, welches einen Gaspermeabilitätskoeffizienten, der hoch genug ist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten, und/oder ein geeignet hohes Flächen-Volumen-Verhältnis aufweist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten.

Genauere Angaben zu den beiden genannten Faktoren und wie diese zu bestimmen sind, ergeben sich aus der Beschreibung der Figuren und auch aus der Beschreibung der hierin offenbarten Verfahren.

Des weiteren wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen umfassend einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen und mindestens ein dazwischen geschaltetes Membranmodul, wobei das Membranmodul eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit gewährleistet.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Membranmodul ein erfindungsgemäßes Membranmodul.

In einer weiteren Ausführungsform enthält der Behälter für Dialyseflüssigkeit mindestens eine Begasungseinrichtung. Technische Voraussetzung dabei ist, dass der Behälter zumindest eine Leitung für die Zufuhr von Gas(en) enthält und mindestens eine (zweite) Leitung für den Abtransport von Gas(en).

In einer noch weiteren Ausführungsform weist die Membran des Membranmoduls einen Gaspermeabilitätskoeffizienten, der hoch genug ist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten und/oder ein geeignet hohes Flächen-Volumen-Verhältnis auf, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten.

Der Erfindung liegt die überraschende Kenntnis zugrunde, daß durch Begasung der zu kultivierenden Zellen während der Passage durch das Membranmodul die zeitlich begrenzte Unterversorgung der Zellen mit Gas, insbesondere mit Sauerstoff im Falle von aeroben oder fakultativ aeroben Zellen, vermieden wird und somit höhere Zelldichten erreicht werden.

Der prinzipielle Aufbau des im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendeten Reaktionssystems ist in Fig. 2 dargestellt. Obwohl in Fig. 2 nur ein Membranmodul dargestellt ist, kann das Reaktionssystem selbstverständlich mehrere parallel geschaltete Membranmoduleinheiten umfassen.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens kann dabei vorgesehen sein, daß der erforderliche Gasaustausch oder die erforderliche Gaszufuhr, bspw. in Form der Zufuhr von Sauerstoff im Falle von aeroben oder fakultativ aeroben Organismen, direkt zu der im Membranmodul enthaltenen Kulturflüssigkeit erfolgt. Dies wird hierin als direkte Begasung bezeichnet. Die direkte Begasung kann dabei so erfolgen, daß Gas direkt über ein in das Membranmodul integriertes Gaszufuhrmittel (15,16) der – in der Regel Zellen enthaltenden –

Kulturflüssigkeit zugeführt wird. Zu diesem Zweck kann im Rahmen der Erfindung das erfindungsgemäße Membranmodul verwendet werden bzw. dieses in dem Reaktionssystem, wie es im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahren verwendet wird, umfaßt sein.

Alternativ kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der erforderliche Gasaustausch in der im Membranmodul enthaltenen Kulturflüssigkeit oder die dorthin erforderliche Gaszufuhr, wie sie hierin beschrieben ist, durch eine indirekte Begasung erfolgen. Die indirekte Begasung oder Gasversorgung erfolgt durch eine Begasung der Dialyseflüssigkeit 18 im Behälter für Dialyseflüssigkeit 1. Hierbei wird eine Gaszu- 21 und Gasabfuhrleitung 22 sowie in der Regel ein Rührwerk 23 eingesetzt. Die mit Gas angereicherte Dialyseflüssigkeit wird über eine Pumpe 9 durch das Membranmodul 8 gepumpt und kann über die Membran 3 das Gas an die Kulturflüssigkeit abgeben. Wichtige Parameter für die indirekte Begasung sind neben der Gaseintragsleistung in den Behälter mit Dialyseflüssigkeit der Permeabilitätskoeffizient der Membran des Membranmoduls für das jeweils betrachtete, d.h. eingetragene Gas und das Flächen-Volumen-Verhältnis des Membranmoduls.

Dabei ist es im Rahmen der Erfindung, daß bei dem erfindungsgemäßen Verfahren beide Formen der Begasung gleichzeitig angewandt werden, wobei es jedoch durchaus Phasen bei der Kultivierung der Zellen geben kann, wo auch nur eine der beiden Begasungsformen angewandt wird.

Die ausschließlich direkte Begasung wie auch die ausschließliche indirekte Begasung stellen somit Extremfälle dar.

Je nach dem Verhältnis der für die Begasung zur Verfügung stehenden Membranfläche sowie deren Durchlässigkeit für das zu transportierende Gas und dem zu begasenden im Membranmodul 8 befindlichen Kulturvolumen, wird der Anteil der direkten (über die Gaszufuhrmittel 15,16) und der indirekten (über die Membran 3) Begasung unterschiedlich sein. Dabei ist grundsätzlich auch die in den Behälter mit Dialyseflüssigkeit, genauer die darin enthaltene Dialyseflüssigkeit, eintragbare Menge des betrachteten Gases zu berücksichtigen.

Ist beispielsweise durch die indirekte Begasung durch das Membranmodul 8 bedingt durch sein hohes Flächen-Volumen-Verhältnis und/oder den hohen Permeabilitätskoeffizienten der eingesetzten Membran für das in Frage stehende Gas, insbesondere Sauerstoff im Falle von aeroben und fakultativ aeroben Zellen, eine ausreichende Gasversorgung über die Membran möglich, kann die direkte Begasung über ein gesondertes Gaszufuhrmittel bzw. unter Verwendung des hierin offenbarten Membranmoduls entfallen.

Im allgemeinen kann die in den beschriebenen Membranmodulen eingesetzte Membran unabhängig vom Begasungstyp aus Cuprophan (regenerierte Zellulose), Polyamid, Polypropylen, Polysulfon oder anderen natürlichen oder synthetischen Stoffen bestehen. Es kann sich dabei um eine Dialysemembran (Ausschlußgröße ("cut off"): 10.000 Dalton), um eine mikroporöse Membran (Ausschlußgröße : 0,2  $\mu\text{m}$ ) oder um Membranen handeln, deren Durchlässigkeit (cut off) dazwischen liegt.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Membran auch im erfindungsgemäßen Membranmodul und/oder im erfindungsgemäßen Reaktionssystem funktional eine Dialysemembran ist.

Im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Verfahren ebenso wie mit dem erfindungsgemäßen Membranmodul und Reaktionssystem haben alle Membranen den Charakter einer Dialysemembran.

Üblicherweise werden in der Technik Membranen aus regenerierter Zellulose (beispielsweise Cuprophan) als Dialysemembranen bezeichnet. Diese Membranen eignen sich nicht zum Einsatz als Filter, da diese (Dialyse-)Membranen hydraulisch nicht durchströmt werden. Die bei einer Dialysemembran wie einer Cuprophan-Membran bei transmembranen Druckunterschieden auftretenden hydraulischen Flüsse sind sehr gering. Die eigentliche Funktion dieser (Dialyse-) Membran beruht darauf, dass sich Konzentrationsunterschiede über die Membran durch Diffusion ausgleichen können.

Nimmt man nun beispielsweise eine mikroporöse Membran mit Poren kleiner 0,2  $\mu\text{m}$  und vermeidet die Ausbildung einer transmembranen Druckdifferenz, so erfolgt auch in diesem



Fall der Transport durch die Membran über die Mechanismen der Diffusion. Hydraulisches Durchströmen wird unter diesen Bedingungen weitgehend vermieden.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens, das in der Regel ohne transmembrane Druckdifferenz durchgeführt wird, unterscheiden sich also poröse und insbesondere mikroporöse Membranen nicht von hydraulisch dichten Membranen (den eigentlichen Dialysemembranen).

Der hierin gewählte Begriff, dass die Membran funktional eine Dialysemembran ist, ist mit Blick auf diese Zusammenhänge zu verstehen. Mit anderen Worten, es kann im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahren bzw. des erfindungsgemäßen Membranmoduls bzw. des erfindungsgemäßen Reaktionssystems vorgesehen sein, dass eine Dialysemembran im eigentlichen Sinne verwendet wird. Es kann jedoch auch vorgesehen sein, dass eine poröse oder insbesondere mikroporöse Membran verwendet wird, sofern sich diese Membran funktional wie eine Dialysemembran verhält, d.h. keine hydraulische Durchströmung zeigt, oder, wenn eine hydraulische Durchströmung auftritt, deren Umfang relativ und insgesamt klein ist verglichen mit dem Stofftransport über die Membran durch Diffusion. Diese Änderung des Charakters der porösen bzw. mikroporösen Membran kann durch die Art, wie die Membran genutzt bzw. betrieben wird, bedingt werden, genauer dadurch, dass über die Membran kein Druck angelegt wird, wie er bspw. bei Perfusionssystemen anliegt.

Die vom Fachmann in diesem Zusammenhang anzustellenden Überlegungen werden in den Beispielen veranschaulicht.

Die Erfindung wird nun im folgenden anhand der beigefügten Zeichnungen weiter erläutert, wobei sich daraus weitere Vorteile und Ausführungsformen der Erfindung ergeben. Es zeigt

Fig. 1 ein Reaktionssystem nach dem Stand der Technik zur Kultivierung von Zellen umfassend einen Kulturraum 2, einen Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 und eine Dialysemembran 3 enthaltendes separates Membranmodul 8;

Fig. 2 das erfindungsgemäße Reaktionssystem, das im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet wird,

Fig. 3 das erfindungsgemäße Membranmodul; und

Fig. 4 ein Plattenmodul der Firma Gambro Medizintechnik GmbH.

Fig. 1, die den grundlegenden Aufbau des gattungsgemäßen Reaktionssystems darstellt, wobei jene Version aufgezeigt wird, bei der das eine Dialysemembran 3 enthaltende Membranmodul 8 außerhalb des Kulturraumes 2 untergebracht ist, wurde bereits in der Einleitung der Beschreibung kurz diskutiert.

Kulturraum 2 enthält Kulturflüssigkeit 17, und im angeimpften Zustand die zu kultivierenden Zellen, die über Zuleitung 5 mit Sauerstoff versorgt werden. Die Sauerstoffversorgung kann dabei so erfolgen, daß Luft, Luft-Sauerstoff-Gemische oder reiner Sauerstoff zugeführt wird. Die an der Austrittsstelle der Zuleitung 5 gebildeten Gasbläschen 7 steigen in der Kulturflüssigkeit nach oben, wobei sie durch das Rührwerk 4 im Kulturraum 2 weiter dispergiert werden. Die verbleibenden Gase, ggf. gemeinsam mit den gasförmigen Reaktionsprodukten werden sodann über Ableitung 6 aus dem Kulturraum abgeleitet. Kulturraum 2 ist über Leitung 13 und 14 mit dem die Dialysemembran 3 enthaltenden Membranmodul 8 verbunden. Mittels Pumpe 10 wird Kulturflüssigkeit aus Kulturraum 2 in das Membranmodul gefördert und von dort über Leitung 14 wieder Kulturraum 2 zugeführt. Der Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 ist mit Dialyseflüssigkeit gefüllt und über Leitung 11 und 12 mit dem Dialysemembran 3 enthaltenden Membranmodul 8 verbunden. Vermittels Pumpe 9 wird Dialyseflüssigkeit aus dem Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 durch das Membranmodul 8 gefördert und über Leitung 12 dem Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 wieder zugeführt.

Bei dieser schematischen Darstellung sind weitere Einrichtungen für das Reaktionssystem, wie sie den Fachleuten geläufig sind, nicht dargestellt, wie z. B. Meßeinrichtungen, Probenahmeeinrichtungen, Einrichtungen zur Medienzu- und -abfuhr sowie zur Substratzufuhr und -abfuhr, Einrichtungen zum Austausch der Dialyseflüssigkeit und dergleichen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann dabei das in Fig. 2 dargestellte erfindungsgemäße Reaktionssystem verwendet werden, welches eine Weiterentwicklung des in Fig. 1 gezeigten Reaktionssystems darstellt. Es umfaßt einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung der Zellen und ein dazwischengeschaltetes Membranmodul, welches als Dialysem modul fungiert. Das Membranmodul kann entweder das erfindungsgemäße Membranmodul, wie in einer Ausführungsform in Fig. 3 dargestellt, sein oder ein Membranmodul mit einem Gaspermeabilitätskoeffizienten, der hoch genug ist, um eine ausreichende indirekte Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul zu gewährleisten und/oder ein geeignet hohes Flächen-Volumen-Verhältnis aufweist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul zu gewährleisten, das erfindungsgemäß in dem erfindungsgemäßen Reaktionssystem verwendet wird. Es ist jedoch auch möglich, daß beide Begasungsarten gleichzeitig verwendet werden und sodann das Reaktionssystem wie in Fig. 2 dargestellt ausgestaltet ist.

Im folgenden werden die verschiedenen realisierbaren Begasungsarten diskutiert. Sofern dabei Luft oder Sauerstoff als Gas angegeben wird, ist der jeweils angesprochene Aspekt nicht auf dieses spezielle Gas beschränkt, sondern dient lediglich der beispielhaften Veranschaulichung. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung prinzipiell eines jeden Gases möglich.

Die direkte Begasung wird dabei so realisiert, daß im Membranmodul im unteren Bereich der röhrenförmigen Membranen Röhrchen 16 als Gaszufuhrmittel konzentrisch angeordnet werden, die in diesem Fall die Gaszufuhrmittel darstellen. Durch diese Röhrchen wird in der vorliegenden Ausführungsform unter erhöhtem Druck sauerstoffhaltiges Gas in den Membraninnenraum, d. h. den durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raum, eingebracht, der Kulturflüssigkeit zusammen mit den zu kultivierenden Zellen enthält. Die Röhrchen sind im vorliegenden Fall untereinander durch eine Zuführleitung 15 verbunden. Die Röhrchen, deren Innendurchmesser 0,2 - 3 mm beträgt, können im Gasauslaßbereich eine Verengung enthalten, die als Düse ausgebildet sein kann, um die Menge des ausströmenden Gases zu begrenzen. Durch die Zuführleitung 15 wird der Organismenkultur Luft zugeführt, der auch Sauerstoff zugemischt werden kann. Es ist auch möglich, für die Begasung reinen

Sauerstoff einzusetzen. Weiterhin ist es möglich, das Membranmodul insgesamt unter einen erhöhten Druck zu setzen, um den Partialdruck des Sauerstoffs im beschriebenen Gasgemisch zu erhöhen und damit die Sauerstoffzufuhr in die die Organismen enthaltende Suspension ebenfalls zu erhöhen.

Die indirekte Begasung erfolgt dabei in dem erfindungsgemäßen Verfahren dadurch, daß das Dialysegefäß 1 über eine Gaszufuhr 21 begast und damit die Dialyseflüssigkeit mit Sauerstoff angereichert wird. Das bezüglich Sauerstoff abereicherte Gas verläßt den Dialysebehälter über die Leitung 22. Die sauerstoffhaltige Dialyseflüssigkeit wird über die Pumpe 9 in das Membranmodul 8 transportiert, wo der Sauerstoff über die Dialysemembran an die zu kultivierenden Zellen, bspw. Mikroorganismen, enthaltende Suspension abgegeben wird. Die indirekte Gasversorgung, d.h. Sauerstoffversorgung hängt wesentlich vom Transportvermögen der Membran im vorliegenden Fall für Sauerstoff und/oder der verfügbare Membranfläche im Verhältnis zu dem zu versorgenden Volumen.

Diese Eigenschaften besitzt das Membranmodul der Firma Gambro, wie es in Fig. 4 schematisch dargestellt ist. Hierbei werden flache Membranen 3 in einem gewissen Abstand angeordnet, wobei jeweils zwei Membranen einen Raum ausbilden, der von der Kulturflüssigkeit 17 durchströmt wird. Der Außenbereich wird vom Dialysat 18 durchströmt. Die Membranen werden durch eine Stützstruktur 19 gehalten.

Eine detaillierte Beschreibung des Membranmoduls wird im Zusammenhang mit Fig. 4 gegeben.

Wie bereits ausgeführt kann im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens neben der direkten Begasung auch eine indirekte Begasung unter Verwendung eines wie in Fig. 4 gezeigten Membranmoduls erfolgen. Dabei kann auch vorgesehen sein, daß die indirekte Begasung über die Dialyseflüssigkeit entfallen kann, wenn die direkte Begasung ausreicht. Umgekehrt kann auch die direkte Begasung über das mit Gaszufuhrmitteln versehene Membranmodul, wie es in Fig. 3 beschrieben ist, entfallen, wenn das Membranmodul infolge seines hohen Flächen-Volumen-Verhältnisses und günstigen Transportverhaltens eine ausreichende Versorgung mit Gas gewährleistet.

Die Betriebsweise des aufgezeigten Reaktionssystems, seine apparatetechnische Ausstattung und das unter seiner Verwendung realisierbare Verfahren zur Kultivierung von Zellen entspricht ansonsten sinngemäß jener bzw. jenem, wie im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung in Fig. 1 dargestellt. Dabei werden bevorzugterweise beide durch die Membran aufgespannten Räume mit dem annähernd gleichen hydrostatischen Druck beaufschlagt. Weiterhin ist bevorzugt, dass sich beide Behälter, deren Volumen mit der Membran in Verbindung stehen, auf annähernd gleichem Druckniveau befinden.

Tatsächlich haben Experimente mit der Kultur von *E.coli* und der in Fig. 2 angegebenen Anordnung unter Verwendung des in Fig. 4 dargestellten Membranmoduls und der dort diskutierten Sauerstoffversorgung in eigenen Experimenten hervorragende Ergebnisse erbracht. Die erreichten Zelldichten von 160 g Trockengewicht/Liter entsprechen jenen, die mit einem Reaktionssystem erreicht werden, bei dem die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert war. Die Experimente zeigen, daß eine Beeinträchtigung des Wachstums durch zeitlich befristeten Sauerstoffmangel nicht auftritt.

Sollte in einem Fall eine weitere Erhöhung der Sauerstoffversorgung über die Membran gewünscht sein, so stehen hierfür weitere Maßnahmen zur Verfügung. Es ist beispielsweise möglich, durch eine Leitung 20 (Fig. 2) zusätzlich gasförmigen Sauerstoff in das Membranmodul auf Seiten der Dialyseflüssigkeit einzutragen. Dieser löst sich im Verlauf der Membranpassage in der Dialyseflüssigkeit. Somit erhöht sich das für die Sauerstoffversorgung maßgebliche Konzentrationsgefälle  $(c_1 - c_2)_{\text{Mittel}}$ .

Eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Dialysat ist auch möglich, in dem das gesamte Druckniveau der Anordnung nach Fig. 2 angehoben wird. Bei einer Verdoppelung des Drucks vom Druckniveau der Umgebung von  $10^5$  Pa auf  $2 \cdot 10^5$  Pa, um ein Beispiel zu nennen, lassen sich auch die entsprechenden Sauerstoffgehalte im Dialysat verdoppeln. Damit erhöht sich entsprechend die Sauerstoffversorgung des Kulturmediums im Membran- bzw. Dialysemodul (Die Begriffe Membranmodul und Dialysemodul können hierin synonym verwendet werden.)

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Kultivieren von Zellen sind ein oder mehrere der folgenden Schritte umfaßt, wobei die Kultivierung in einem derartigen gattungsgemäßen Reaktionssystem den Fachleuten auf dem Gebiet prinzipiell bekannt ist: a) Bereitstellen eines

Reaktionssystems umfassend ein Kulturgefäß (Kulturraum), ein externes Membranmodul, welches die erfindungsgemäße Vorrichtung, d.h. das erfindungsgemäße Membranmodul oder ein kommerziell erhältliches Membranmodul mit den erforderlichen Eigenschaften (Flächen-Volumen-Verhältnis, Sauerstoffpermeabilitätskoeffizient) und einen Behälter für Dialyseflüssigkeit umfaßt, wobei das Reaktionssystem, wie auch die darin enthaltenen Flüssigkeiten, bevorzugt sterilisiert wurde, b) Inokulieren des Kulturgefäßes mit den zu kultivierenden Zellen, c) Bereitstellen einer geeigneten Temperatur, Substrat- und Sauerstoffversorgung, d) Führen der Kulturflüssigkeit, die die zu kultivierende Zellsuspension enthält, aus dem Kulturgefäß durch die Dialysevorrichtung und Rückführen der Kulturflüssigkeit zum Kulturgefäß unter gleichzeitigem Kreisführen der Dialyseflüssigkeit aus dem Behälter für Dialyseflüssigkeit durch die Dialysevorrichtung zurück in den Behälter für Dialyseflüssigkeit, wobei die beiden Flüssigkeitsströme bevorzugt im Gegenstrom geführt werden, und e) Ernten der kultivierten Zellen.

Obwohl die vorstehenden Ausführungen weitestgehend im Zusammenhang mit der Kultivierung von Mikroorganismen, insbesondere E.coli, erfolgt sind, ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung, der Reaktionssysteme oder des Verfahrens in keinsten Weise darauf beschränkt.

Bei den im Zusammenhang mit der Vorrichtung, der Verwendung, den Reaktionssystemen und den Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendeten Zellen können auch photosynthetische Zellen verwendet werden, unabhängig davon, ob es sich dabei um prokaryontische oder eukaryontische Zellen, mithin um photosynthetisch aktive mikrobielle oder pflanzliche Zellen handelt.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit die Versorgung von Zellen mit Sauerstoff.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Beseitigung von Gasen bzw. gasförmigen Stoffwechselprodukten, wie sie in Kulturen von Zellen auftreten. Dabei spielt die Überlegung eine Rolle, daß der Vorgang des Eintragens von Gasen im Prinzip, zumindest was die physiko-chemischen Vorgänge dabei anbelangt, ähnlich dem des Austragens von Gasen ist. Dabei kann unter dem Einfluß des Einführens, insbesondere Einblasen, eines

Gases, ein anderes oder gleiches Gas aus der Flüssigkeit entfernt werden. Im vorliegenden Fall kann diese Flüssigkeit die Kulturraumflüssigkeit (Medium) und/oder die Dialyseflüssigkeit sein. Insoweit kann die erfindungsgemäße Vorrichtung dazu verwendet werden, Gase aus der Flüssigkeit in dem/den Reaktionssystem(en) oder einem Teil davon zu entfernen. Dies gilt auch für den Fall der erfindungsgemäßen der Verwendung eines Membranmoduls.

Beispielhaft seien einige derartige Kultivierungssysteme angeführt, bei denen sich das Strippen gasförmiger Stoffwechselprodukte als vorteilhaft erwiesen hat.

Bei photosynthetisch aktiven Zellen, beispielsweise pflanzlichen Zellen oder Algen, wird typischerweise Kohlendioxid dem Kulturmedium zugesetzt. Dies kann unter Verwendung eines entsprechend ausgelegten Membranmoduls oder der erfindungsgemäßen Vorrichtung erfolgen, wobei für die Auslegung der Begasungsvorrichtung bzw. des verwendeten membranmoduls Berechnungen anzustellen sind, die ähnlich den obigen zur Sauerstoffversorgung von Escherichia coli-Kulturen sind, und den Fachmann in die Lage versetzen, die erforderliche Menge an Kohlendioxid der Kultur zuzuführen. Gleichzeitig ist es bei hochdichten Kulturen derartiger Zellen erforderlich, den infolge der photosynthetischen Aktivität der Zellen entstandenen Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen. Auch dies kann durch die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. Verwendung eines Membranmoduls bewerkstelligt werden. Die Begasung wird, unter Einstellung geeigneter Partialdrücke, typischerweise unter Verwendung eines Gemisches aus Luft und Kohlendioxid erfolgen.

Ein weiteres Beispiel für den Aspekt der Erfindung betreffend das Entfernen von Gasen aus Flüssigkeiten gemäß der vorliegenden Erfindung stellt die Kultivierung von Pyrococcus dar. Hier ist die Begasung mit Stickstoff, oder einem Gemisch aus Stickstoff und Kohlendioxid für das Erreichen hoher Zelldichten erfolgreich. Die entsprechende Offenbarung hierzu von Krahe, M. FEMS Microbiology reviews 18 (1995) 271 – 285 wird hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

Der Fachmann wird somit, wann immer die Gaszufuhr bzw. -abfuhr für die Kultivierung von Zellen hilfreich oder erforderlich scheint, oder mit anderen Worten, der Gasstoffwechsel einer

Kultur von Bedeutung für die Kultivierung der Zellen ist, auf die Vorrichtung, Verwendung, Reaktionssysteme und Verfahren nach der vorliegenden Erfindung zurückgreifen (können).

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das vorbeschriebene Reaktionssystem verwendet werden. Dabei kann vorgesehen sein, daß entweder das Behältnis 1 mit der Dialyseflüssigkeit oder das eigentliche Kulturgefäß, d. h. der Kulturraum, oder beide, batchweise, semikontinuierlich, oder kontinuierlich betrieben werden. Neben der Begasung in der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann die Begasung im Kulturraum und/oder im Behälter für Dialyseflüssigkeit, genauer in der Dialyseflüssigkeit (oder Dialysat 18) erfolgen. Im Kulturgefäß können prinzipiell jegliche Formen von Zellen kultiviert werden, d. h. prokaryontische und eukaryontische Zellen, insbesondere Mikroorganismen, Pilzzellen, tierische Zellen und Pflanzenzellen. Im Kulturgefäß liegen die Zellen typischerweise in Suspension vor. Hinsichtlich der Betriebsweise, insbesondere des Kulturgefäßes, ist jede denkbare Fütterungsstrategie möglich, so beispielsweise und insbesondere auch fedbatch oder split feed strategy, die beispielsweise beschrieben ist Ogbonna, J. Ch. und Märkl, H.; Biotechnology and Bioengineering Vol. 41, S. 1092 - 1100 (1993), deren Offenbarungsgehalt hierin vollumfänglich aufgenommen wird. Dabei wird entsprechend den Nährstoffbedingungen der Kultur selektiv die ansonsten limitierenden Substrate, wie beispielsweise eine Kohlenstoffquelle, eine Stickstoffquelle und/oder bestimmte Salze hinzugefügt.

Fig. 3 zeigt das erfindungsgemäße Membranmodul, das als Membranmodul 8 beispielsweise in das in Fig. 1 oder Fig. 2 gezeigte Reaktionssystem eingebaut werden kann, d. h. als separates Membranmodul 8 zwischen Kulturraum 2 und den Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 zwischengeschaltet werden kann.

Der Aufbau des Membranmodules 8 besteht aus insgesamt zwei Gruppen von Räumen, die jeweils in einer Mehrzahl vorhanden sind, zum einen jene Räume, in denen sich Kulturflüssigkeit 17 befindet bzw. durch die diese strömt, und zum anderen jene Räume, die die Dialyseflüssigkeit enthalten. Im vorliegenden Fall bildet die Dialysemembran im Membranmodul 8 Röhren aus, hierin summarisch als röhrenförmige Membran bezeichnet, innerhalb derer die Kulturflüssigkeit geführt wird. Die dazwischen liegenden Räume, durch das Membranmaterial von der Kulturflüssigkeit getrennt, werden von der Dialyseflüssigkeit



durchströmt. Das Modul ist über die Zuleitung 13 und die Ableitung 14 mit dem Kulturgefäß verbunden. Im Falle einer Suspensionskultur im Kulturraum 2 durchströmen die Zellen hierbei das Innere der röhrenförmigen Membran(en) von unten nach oben. Die Membranaußenwand wird von der Dialyseflüssigkeit umströmt, die über die Leitungen 11 und 12 mit dem Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 ausgetauscht wird. Insoweit bilden Zuleitung 13 und Ableitung 14 und Zuleitung 11 und Ableitung 12 jeweils einen Satz für die Zu- und Abfuhr von flüssigem Medium zu und von dem durch die röhrenförmige(n) Membran(en) ausgebildeten Raum bzw. zu und von dem außerhalb des durch die röhrenförmige(n) Membran(en) ausgebildeten Raumes gelegenen Raum. In der vorliegenden Ausführungsform ist dabei vorgesehen, daß für die beiden Seiten des Dialysemoduls, d. h. Dialyseflüssigkeit bzw. zu dialysierende Flüssigkeit, d. h. Kulturflüssigkeit, nur jeweils eine Zu- bzw. Ableitung vorgesehen ist. Es ist jedoch auch möglich, jeweils mehrere dieser Zu- bzw. Ableitungen auf einer jeden Seite vorzusehen.

Sofern das erfindungsgemäße Membranmodul in dem erfindungsgemäßen Reaktionssystem eingebaut vorliegt, wird eine Druckerhöhung im Membranmodul zweckmäßigerweise durch eine gleichzeitige Erhöhung des Drucks im Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 und dem Kulturraum 2 erreicht. Durch diese Maßnahme ist es möglich, wie eigene Experimente gezeigt haben, eine Sauerstoffversorgung im notwendigen Bereich zwischen 5 und 15 g/(l h) [d.h. kg O<sub>2</sub> pro m<sup>3</sup> Kulturflüssigkeit und Stunde] ohne weiteres zu realisieren

Das Gas oder Gasgemisch strömt das durch die Zuführleitung 15 durch den Innenraum der Membran 3, verläßt das Membranmodul durch die Ableitung 14, gelangt von dort in das Kulturgefäß 2 und verläßt dieses zusammen mit dem Abgas des ebenfalls mit Sauerstoff versorgten Kulturraums 2 durch die Öffnung 6 im Deckel des Kulturraums 2.

Das Gas wird über die Röhrchen 16 in den Innenraum der Membran 3 unter einem gewissen Überdruck eingebracht. Abhängig von der Höhe des Überdruckes erhält das Gas eine gewisse Geschwindigkeit, mit der es in die die Mikroorganismen enthaltende Suspension eintritt. Da das Gas durch die Flüssigkeit abgebremst wird, überträgt sich ein Impuls auf die Flüssigkeit, die zur Förderung der Flüssigkeit im Inneren der röhrenförmigen Membran 3 beiträgt. Ein weiterer Fördereffekt entsteht aufgrund des hohen Gasgehalts, der sich im Membraninnenraum einstellt. Da dieser Gasgehalt bei entsprechend starker Gaszufuhr höher

als im eigentlichen Kulturraum 2 ist, stellt sich ein zusätzlicher Pumpeffekt ein (Mammutpumpeneffekt). Aus diesem Grund kann bei entsprechend hoher Begasung des Membranmoduls auf die Förderpumpe 10 in einem die erfindungsgemäße Vorrichtung enthaltenden Reaktionssystem verzichtet werden.

Das Membranmodul 8 wird im Regelfall möglichst nahe am Kulturraum 2 angebracht, damit die unbegaste Zufuhrleitung 13 zwischen Kulturraum und Membranmodul möglichst kurz ist und demzufolge die in der Kulturflüssigkeit enthaltenen Zellen nur möglichst kurz den Bedingungen einer nicht optimalen Gasversorgung ausgesetzt sind.

Figur 4 zeigt einen Querschnitt durch ein Membranmodul, das erfindungsgemäß für das Begasen von Kulturflüssigkeit für die Kultivierung von Zellen verwendet werden kann. Der in Fig. 4 konkret dargestellte Querschnitt stammt von einem kommerziell erhältlichen Plattenmodul mit der Bezeichnung Gambro LunDia: Alpha 600 der Firma Gambro Medizintechnik GmbH. Das Membranmaterial ist Cuprophan®. Die Wandstärke der Membran beträgt 8 µm (im trockenen Zustand), die Membranfläche beträgt 1,3 m<sup>2</sup> und die Anzahl der Membranlagen pro Modul beträgt 70. Das Volumen des Raumes 17, der bei einem erfindungsgemäßen Betrieb Kulturflüssigkeit und Zellen enthält, beträgt 100 ml.

Derartige Membranmodule werden derzeit lediglich in der Hämodialyse verwendet und zu diesem Zweck hergestellt, nicht jedoch bei der Kultivierung von Zellen und insbesondere nicht in einem Reaktionssystem der gattungsgemäßen Art, wie dies schematisch für den Fall, daß das Membranmodul als eigenständige Einheit angeordnet ist, in Fig. 1 und Fig. 2 dargestellt ist.

Im Rahmen von Untersuchungen wurde überraschenderweise festgestellt, daß unter bestimmten Voraussetzungen auch diese kommerziell erhältlichen Membranmodule dann verwendet werden können, wenn infolge ihres Flächen-Volumen-Verhältnisses und des Permeabilitätskoeffizienten für Sauerstoff eine für die Zellen ausreichende indirekte Sauerstoffversorgung gewährleistet wird.

Hierzu sind einige im folgenden angeführte Überlegungen anzustellen und insbesondere die Permeabilitätskoeffizienten für Sauerstoff zu bestimmen, was jedoch im Rahmen der

Fähigkeiten des Durchschnittsfachmannes erfolgen kann. Die Bestimmung von Permeabilitätskoeffizienten ist zum Beispiel für die Verbindung Glycerin beschrieben in Märkl, H. et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993) 39: 48-52.

Bei dem beispielhaft hier angesprochenen Plattenmodul Gambro LunDia Alpha 600 ermöglicht die vorgegebene Konstruktion ein extrem hohes Verhältnis von Membranfläche zu zu versorgendem Volumen.

Die aktive Membranfläche beträgt bei der Ausführung LunDia Alpha 600 1,3 m<sup>2</sup>. Das Volumen des mit Sauerstoff zu versorgenden Raumes beträgt 100 ml, so daß das Flächen-Volumen-Verhältnis

$$F/V = 13 \text{ m}^2/\text{l (LunDia)}$$

beträgt.

Im Vergleich sei das entsprechende Flächen-Volumen-Verhältnis für ein Membranröhrchen angegeben, wie es in der in Fig. 2 skizzierten Anordnung eingesetzt wird. In diesem Fall muß der Innenraum des Röhrchens versorgt werden. Als Transportfläche steht die Mantelfläche der zylinderförmigen Membranfläche zur Verfügung. Am Beispiel eines Röhrchens mit 5 mm Durchmesser errechnet sich

$$F/V = 0,8 \text{ m}^2/\text{l (5 mm Röhrchen)}$$

Bei einem Röhrchendurchmesser von nur 1 mm erhält man einen Wert von

$$F/V = 4 \text{ m}^2/\text{l (1 mm Röhrchen)}.$$

Eine Beispielrechnung zeigt, daß mit dem Membranmodul LunDia Alpha 600 tatsächlich über die Membran eine ausreichende indirekte Sauerstoffversorgung erreicht werden kann:

Der Sauerstofftransport, bezogen auf das zu versorgende Volumen, beträgt:

$$S = F/V * P * (c_1 - c_2)_{\text{Mittel}}$$

Hierbei ist  $F/V = 13 \text{ m}^2/\text{l}$ .

P ist der Permeabilitätskoeffizient. Dieser wurde in eigenen Experimenten für eine Membran, Typ Cuprophane, wie sie im genannten Modul eingesetzt wird, zu  $P = 0,066 \text{ cm/min}$  bestimmt. Dieser Wert gilt für eine Membran der Dicke  $20 \text{ }\mu\text{m}$  (Dicke gemessen im trockenen Zustand). Im Membranmodul LunDia Alpha 600 wird eine Cuprophane-Membran der Dicke  $8 \text{ }\mu\text{m}$  eingesetzt, so daß der tatsächliche Permeabilitätskoeffizient eher höher liegt und die vorgestellte Rechnung einen eher "unteren" Wert ergibt.

Das Konzentrationsgefälle  $(c_1 - c_2)$  über die Membran wird mit

$$(c_1 - c_2)_{\text{Mittel}} = 11,45 \text{ mg/l}$$

angenommen. In diesem Rechenbeispiel wird davon ausgegangen, daß dem Membranmodul aus dem Behälter für Dialyseflüssigkeit 1 ein Dialysat mit einem Sauerstoffgehalt von  $30 \text{ mg/l}$  zufließt. Hierbei wird angenommen, daß der Behälter mit reinem Sauerstoff begast wird (die Sättigungskonzentration für reinen Sauerstoff beträgt ca.  $32 \text{ mg/l}$ ). Im Membranmodul wird das Dialysat auf eine Konzentration von  $4 \text{ mg/l}$  abgereichert. Mit dieser Konzentration wird das Dialysat wieder dem Behälter zugeführt. Es ist also auf der Dialysatseite mit einem Sauerstoffgehalt  $c_1$  zu rechnen, der sich von  $30 \text{ mg/l}$  (Moduleingang) auf  $4 \text{ mg/l}$  (Modulaustritt) verringert. Der Sauerstoffgehalt auf der Kulturseite soll bei einem für das Wachstum der Organismen ausreichenden Wert von konstant  $c_2 = 1 \text{ mg/l}$  liegen. Mit diesen Annahmen berechnet sich

$$(c_1 - c_2)_{\text{Mittel}} = \frac{(c_{1\text{Eingang}} - c_2) - (c_{1\text{Ausgang}} - c_2)}{\ln\left(\frac{c_{1\text{Eingang}} - c_2}{c_{1\text{Ausgang}} - c_2}\right)} = 11,45 \text{ mg/l}$$

Mit den angenommenen Daten ergibt sich ein Wert für die auf das Kulturvolumen bezogene Sauerstoffversorgung von

$$S = 5,9 \text{ g/(l}\cdot\text{h)}.$$

Da der tatsächliche Permeabilitätskoeffizient, der die Durchlässigkeit der Membran für Sauerstoff angibt, in der Realität wegen der geringen Membrandicke von nur 8  $\mu\text{m}$  deutlich über dem in der Rechnung angenommenen Wert von 0,066 cm/min liegt, wird in der Realität eine bessere Sauerstoffversorgung der Organismensuspension in der Membran erreicht werden, als er hier rechnerisch angegeben wird. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die Sauerstoffversorgung von Mikroorganismen in einem externen Membranmodul über die Membran, wenn das Flächen-Volumen-Verhältnis ausreichend groß ist und eine gute Permeabilität der Membran für Sauerstoff vorliegt, in einem Bereich liegt, der als "ausreichend" anzusehen ist.

Der Begriff "ausreichend" orientiert sich am Bedarf der jeweiligen Zellen bzw. an der Versorgung, wie sie in dem Kulturgefäß 2 realisiert wird. Bei der technischen Kultur von E. coli Zellen, um ein Beispiel zu nennen, sind Werte üblich, die im Bereich zwischen 5 und 15 g / (l h) liegen.

Aufgrund dieser Zusammenhänge kann der Fachmann in Kenntnis bzw. nach Bestimmung des Sauerstoffpermeabilitätskoeffizienten sowie des Flächen-Volumen-Verhältnisses des jeweils verwendeten Moduls leicht ermitteln, ob dieses für die erfindungsgemäße Verwendung geeignet ist. Für den Fall, daß mit dem Membranmodul die erwünschte Versorgung mit Gas nicht gewährleistet werden kann, kann ein Membranmodul nach Fig. 3 verwendet werden und dann sowohl eine indirekte als auch direkte Sauerstoffversorgung vorgenommen werden.

Die vorstehend geschilderten Zusammenhänge wurde vom Erfinder völlig überraschend erkannt und insbesondere die Möglichkeit, das ansonsten lediglich für die Hämodialyse verwendete System in dem gattungsgemäßen Reaktionssystem als separates Membranmodul einzusetzen, wobei, wie im Zusammenhang mit Fig. 2 weiter erläutert ist, der Sauerstoffeintrag in die Dialyseflüssigkeit von Behälter 1 erfolgt und die solchermaßen angereicherte Dialyseflüssigkeit genügend Sauerstoff transportiert, um den Kulturraum 2 bzw. die darin enthaltenen Zellen zu versorgen und, in einem weiteren Aspekt, insbesondere die bei der Passage des Membranmoduls unter Sauerstofflimitierung leidenden Zellen in hinreichender bzw. erforderlicher Weise mit Sauerstoff zu versorgen, so daß die in der Kulturflüssigkeit erzielbare Zelldichte nicht durch die besagte Sauerstofflimitierung bei der

Passage der Zellen durch das Membranmodul begrenzt wird. Zwar war die Verwendung von Dialysemembranen zur Entfernung von toxischen Stoffwechselprodukten, wie auch eingangs bereits ausgeführt, bekannt, jedoch war nicht bekannt, daß bei Verwendung von entsprechenden Membranen gleichzeitig die vorstehend geschilderte Sauerstoffversorgung gewährleistet werden kann. Es besteht somit ein Zusammenhang zwischen der erfindungsgemäßen Vorrichtung sowie der erfindungsgemäßen Verwendung dergestalt, daß das zu lösende Problem darin bestand, eine Sauerstofflimitierung der Zellen während deren Passage durch das Membranmodul zu vermeiden. Dies wird im Falle der erfindungsgemäßen Vorrichtung dadurch erreicht, daß bevorzugt in den Innenraum der membranförmigen Membranen Sauerstoff eingeblasen wird und im Falle der erfindungsgemäßen Verwendung der kommerziell erhältlichen Plattenmodule solche ausgewählt werden mit einem ausreichend großen Flächen-Volumen-Verhältnis sowie ausreichend hohem Sauerstoffpermeabilitätskoeffizienten, so daß die im Behältnis für die Dialyseflüssigkeit 1 mit Sauerstoff angereicherte Dialyseflüssigkeit diesen über die Dialysemembran an die durch das Membranmodul passagierenden Zellen abgeben kann. In beiden Fällen wird das Problem der Sauerstofflimitierung der das Membranmodul passierenden Zellen gelöst.

Ein vorstehend beschriebenes und in Fig. 4 schematische dargestelltes Membranmodul kann in dem gattungsgemäßen Reaktionssystem verwendet werden, wie dies beispielsweise in Fig. 2 dargestellt ist.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Bezugszeichenliste

- 1 Behälter für Dialyseflüssigkeit
- 2 Kulturraum
- 3 Dialysemembran
- 4 Rührwerk (im Kulturraum)
- 5 Gaszufuhrleitung
- 6 Abluftleitung
- 7 Gasbläschen
- 8 Membranmodul
- 9 Pumpe (für Dialyseflüssigkeit)
- 10 Pumpe (für Kulturflüssigkeit)
- 11 Leitung (für Dialyseflüssigkeit)
- 12 Leitung (für Dialyseflüssigkeit)
- 13 Leitung (für Kultursuspension)
- 14 Ableitung (für Kultursuspension)
- 15 Zufuhrleitung (für Röhrchen 16)
- 16 Röhrchen
- 17 Kulturflüssigkeit
- 18 Dialyseflüssigkeit
- 19 Stützstrukturen
- 20 Leitung (zum Membranmodul)
- 21 Gaszufuhrleitung
- 22 Abluftleitung
- 23 Rührwerk (im Behälter für Dialyseflüssigkeit)

Ansprüche

1. Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen eingetragen wird, dadurch gekennzeichnet, daß ein zweites Gas in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird und die Membran funktional eine Dialysemembran ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine direkte Begasung der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit erfolgt, indem das zweite Gas direkt in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine indirekte Begasung der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit erfolgt, indem das zweite Gas in die Dialyseflüssigkeit in dem Behälter für die Dialyseflüssigkeit eingetragen wird und von dort über die Membran des Membranmoduls in die im Membranmodul befindliche Kulturflüssigkeit gelangt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß neben der direkten Begasung gleichzeitig die indirekte Begasung erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul mindestens ein Gaszufuhrmittel umfaßt und das Gaszufuhrmittel das zweite Gas zu mindestens einem der durch die Membran getrennten, eine Flüssigkeit führenden Räume zuführt.



6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Gaszufuhrmittel eine Austrittsöffnung aufweist, die sich insbesondere in dem die Kulturflüssigkeit führenden Raum des Membranmoduls befindet.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Gaszufuhrmittel ein Röhrchen ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Gaszufuhrmittel als Düse ausgebildet ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran des Membranmoduls aus einem Material besteht, das ausgewählt ist der Gruppe, die regenerierte Cellulose, Polyamid, Polypropylen und Polysulfon umfaßt.
10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul ein Plattenmodul ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran des Membranmoduls eine Dialysemembran ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Material der Dialysemembran Cuprophane ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul bedingt durch sein Flächen-Volumen-Verhältnis und seinen Permeabilitätskoeffizienten für das Gas einen für die Zellen ausreichenden Gasaustausch vorsieht.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Flächen-Volumen-Verhältnis mindestens etwa 5 m<sup>2</sup> pro Liter, insbesondere mindestens 10 m<sup>2</sup> pro Liter beträgt.

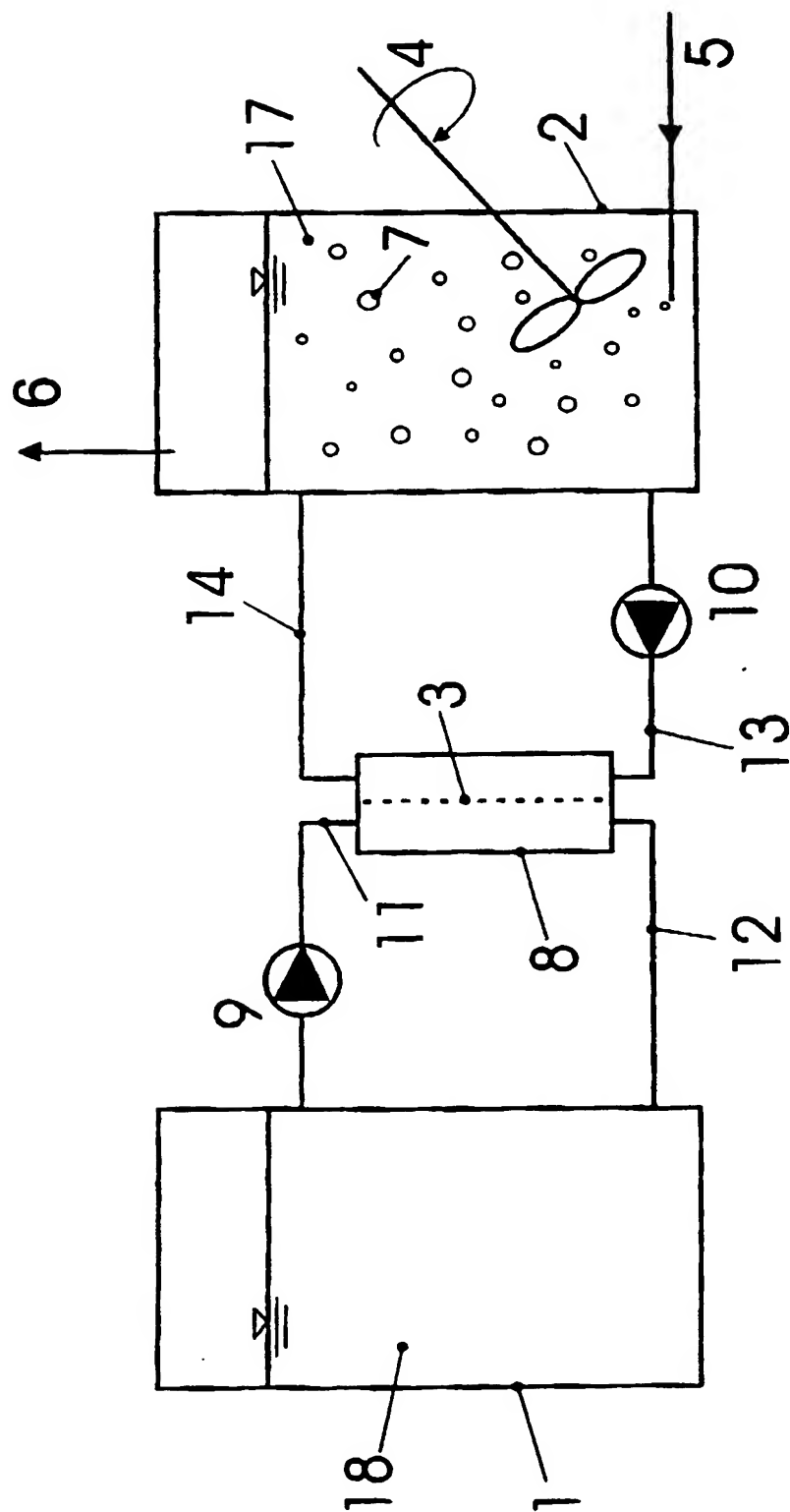
15. Verfahren nach Anspruch 14 dadurch gekennzeichnet, daß das Flächen-Volumen-Verhältnis etwa  $13 \text{ m}^2$  pro Liter beträgt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Sauerstoff-Permeabilitätskoeffizient etwa 0,066 cm pro Minute oder mehr beträgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter für Dialyseflüssigkeit ein Mittel zum Zuführen von Gas und/oder ein Mittel zum Abführen von Gas aufweist.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul, der Raum für die Kultivierung der Zellen und/oder der Behälter für Dialyseflüssigkeit einen erhöhten Druck aufweist.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das erste und zweite Gas einzeln und unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe, die Luft, Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid und Mischungen davon umfaßt.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Gas Sauerstoff ist.
21. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Gas Kohlendioxid ist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen ausgewählt sind aus der Gruppe, die mikrobielle Zellen, Pilzzellen, tierische Zellen und pflanzliche Zellen umfaßt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Zellen von *Escherichia coli* sind.
24. Membranmodul welches mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume umfaßt und jeder Raum mit einer Flüssigkeit durchströmt wird, wobei die Flüssigkeit

in einem Raum Dialyseflüssigkeit und in dem anderen Raum Kulturflüssigkeit ist, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul mindestens ein Gaszufuhrmittel umfaßt und das Gaszufuhrmittel in mindestens einem der durch die Membran getrennten Räume eine Austrittsöffnung aufweist.

25. Membranmodul nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran röhrenförmig ausgebildet ist und durch ihr Volumen einen der beiden Räume ausbildet.
26. Membranmodul nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Durchmesser des durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raumes etwa 3 - 10 mm, bevorzugt 6 - 8 mm, beträgt.
27. Membranmodul nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul mehrere durch eine röhrenförmige Membran ausgebildete Räume umfaßt.
28. Membranmodul nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß sich in mindestens einem der durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Räume eine Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels befindet.
29. Membranmodul nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß sich die Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels in einem Raum außerhalb des/der durch die röhrenförmige Membran ausgebildeten Raumes/Räume befindet.
30. Membranmodul nach einem Ansprüche 24 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Gaszufuhrmittel ein Röhrchen ist.
31. Membranmodul nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Röhrchen konzentrisch in dem Raum angeordnet ist.
32. Membranmodul nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Röhrchen einen Innendurchmesser von 0,2 mm bis 3 mm aufweist.

33. Membranmodul nach einem der Ansprüche 24 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Austrittsöffnung des Gaszufuhrmittels als Düse ausgebildet ist.
34. Verwendung des Membranmoduls nach einem der Ansprüche 24 bis 33 als Membranmodul in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23.
35. Reaktionssystem zur Kultivierung von Zellen umfassend einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen und mindestens ein dazwischen geschaltetes Membranmodul, wobei das Membranmodul eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit gewährleistet.
36. Reaktionssystem nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranmodul ein solches nach einem der Ansprüche 24 bis 33 ist.
37. Reaktionssystem nach Anspruch 35 oder 36, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter für Dialyseflüssigkeit mindestens eine Begasungseinrichtung enthält.
38. Reaktionssystem nach Anspruch 35 oder 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran des Membranmoduls einen Gaspermeabilitätskoeffizienten aufweist, der hoch genug ist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten und/oder ein geeignet hohes Flächen-Volumen-Verhältnis aufweist, um eine ausreichende Gasversorgung während der Passage der Kulturflüssigkeit durch das Membranmodul oder einen ausreichenden Gasaustausch in der im Membranmodul befindlichen Kulturflüssigkeit zu gewährleisten.

Fig. 1



2

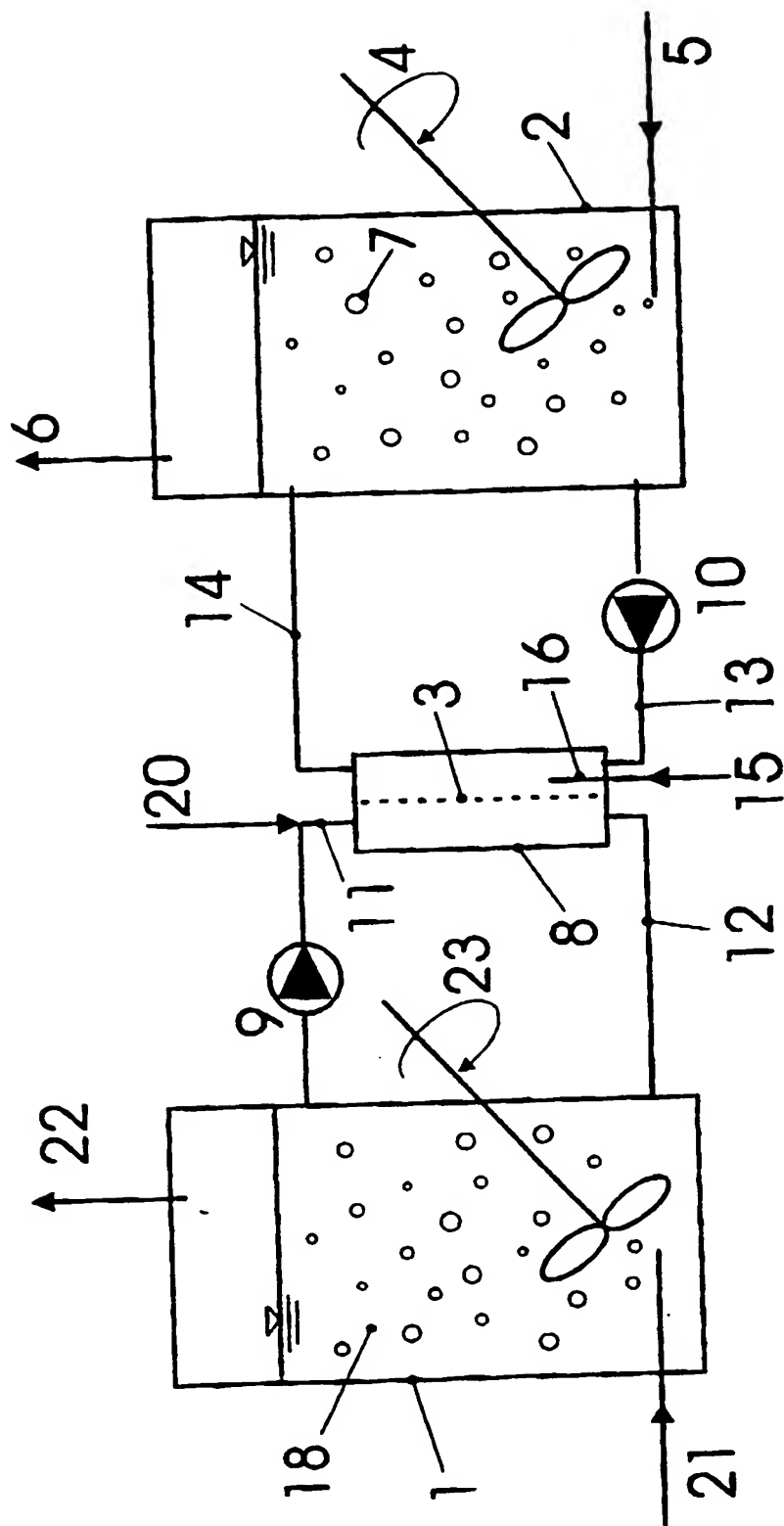
“

”

“

”

Fig. 2







3/4

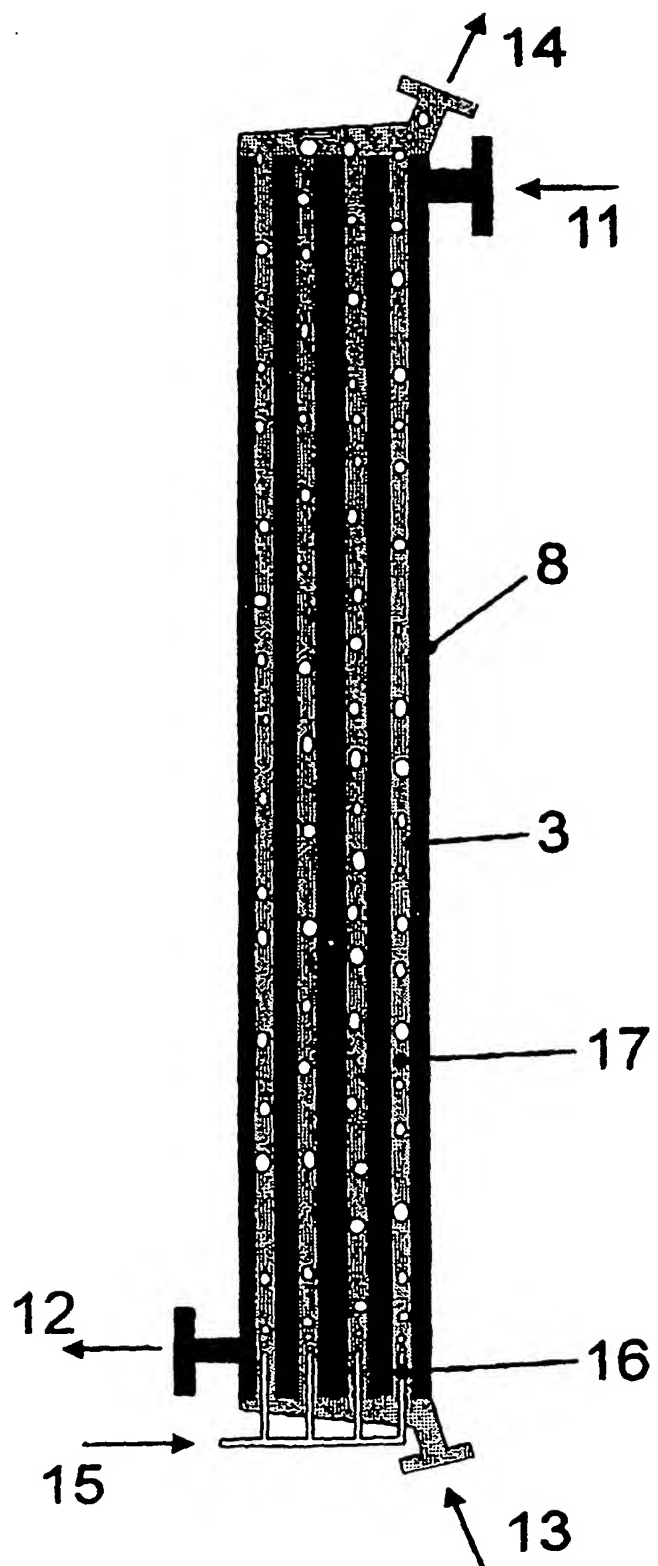


Fig. 3



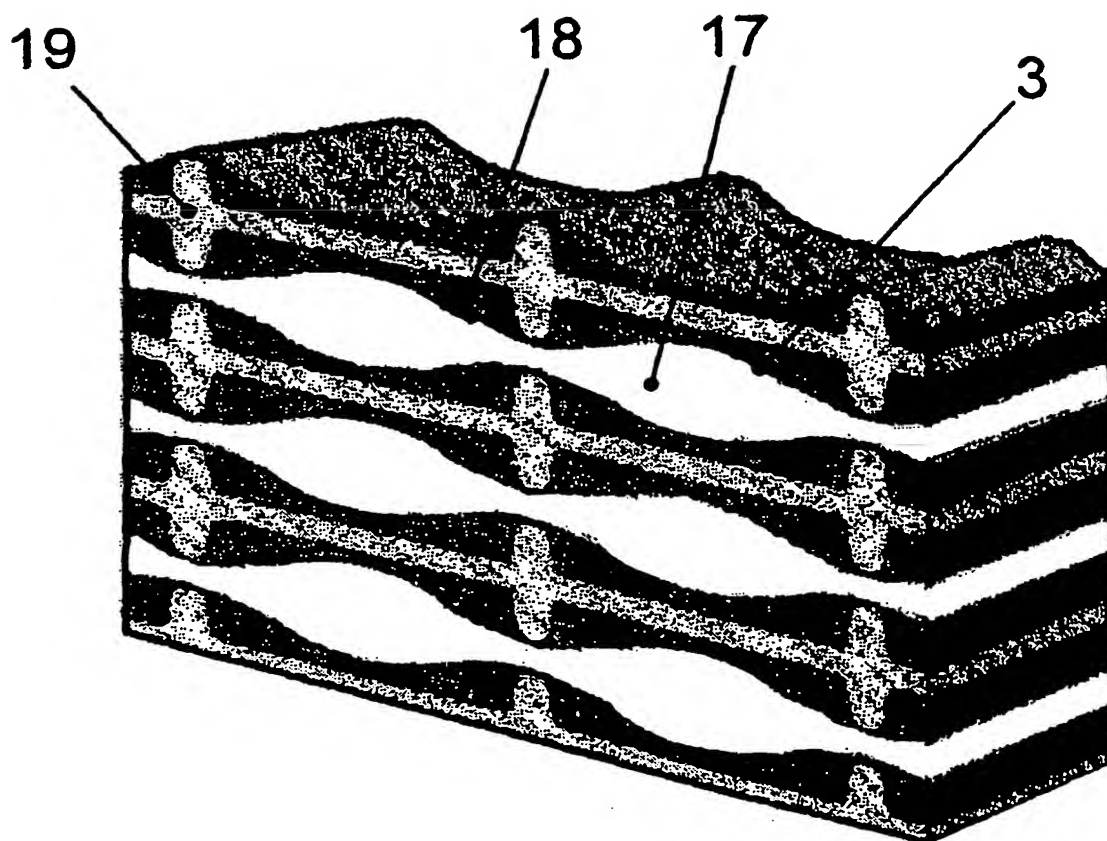


Fig. 4



10

11

Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.*

**Published**

*Without the International Search Report and to be republished once the report has been received.*



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. März 2001 (29.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/21759 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12M 1/12, 3/06

(72) Erfinder; und

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/03305

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÄRKEL, Herbert  
[DE/DE]; Kleckener Kirchweg 27, D-21218 Seevetal  
(DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. September 2000 (21.09.2000)

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 45 162.1 21. September 1999 (21.09.1999) DE

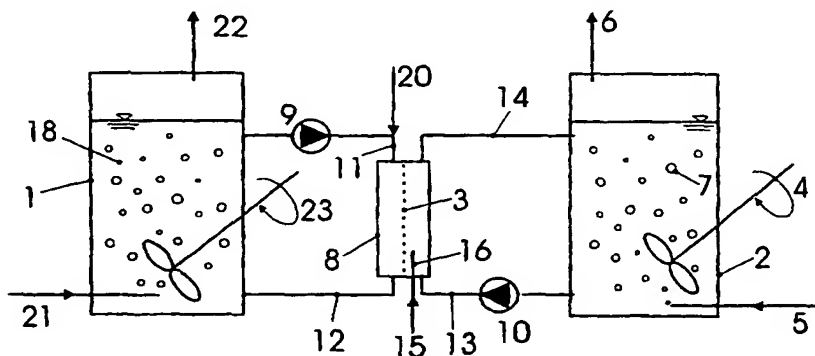
(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GMBH [—/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt am Main (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING CELLS. A MEMBRANE MODULE. UTILIZATION OF A MEMBRANE MODULE AND REACTION SYSTEM FOR CULTIVATION OF SAID CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN, MEMBRANMODUL, VERWENDUNG EINES MEMBRANMODULS UND REAKTIONSSYSTEM ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for cultivating cells utilizing a reaction system, whereby the reaction system comprises a compartment for dialysis fluid, a compartment for cultivating cells and a membrane module connecting both compartments, whereby each membrane module has at least two compartments which are separated from each other by said membrane, one of said compartments being flooded by dialysis fluid while the other compartment is flooded by culture fluid containing cells. A first gas is introduced into said culture fluid in said compartment for cell cultivation and a second gas is introduced into said culture fluid in the membrane module. Said membrane is a functional dialysis membrane.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von Zellen unter Verwendung eines Reaktionssystems, wobei das Reaktionssystem einen Behälter für Dialyseflüssigkeit, einen Raum für die Kultivierung von Zellen sowie ein beide Räume miteinander verbindendes Membranmodul umfaßt, wobei das Membranmodul mindestens zwei durch eine Membran getrennte Räume aufweist, deren einer von einer Dialyseflüssigkeit und deren anderer von Zellen enthaltender Kulturflüssigkeit durchströmt wird, und ein erstes Gas in die Kulturflüssigkeit in dem Raum für die Kultivierung der Zellen und ein zweites Gas in die Kulturflüssigkeit im Membranmodul eingetragen wird, und die Membran funktional eine Dialysmembran ist.

WO 01/21759 A3



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

27. Dezember 2001



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/03305

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12M1/12 C12M3/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 371 783 A (HITACHI LTD) 6 June 1990 (1990-06-06)	1,2,4,8, 9,13-17, 19-22, 24-27, 35,36
Y	figure 2; example 5	1-3
Y	US 3 915 802 A (KOMINEK LEO A) 28 October 1975 (1975-10-28) column 4, paragraph 2; figure 1	1-3
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 413 (C-0877), 22 October 1991 (1991-10-22) & JP 03 172170 A (ASAHI MEDICAL CO LTD), 25 July 1991 (1991-07-25) abstract	1,3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*8\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 July 2001

Date of mailing of the international search report

12/07/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/03305

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	WO 00 46354 A (PROTEIN SCIENCES CORP) 10 August 2000 (2000-08-10) figures 1,3,9 ---	1-3
X	WO 87 06610 A (ENDOTRONICS INC) 5 November 1987 (1987-11-05) ---	1,3,9, 19,22, 35,37 1-3
Y	page 6, line 05 -page 7, line 20; figure 1; example 1 ---	
A	US 4 806 484 A (PETROSSIAN ASHOT ET AL) 21 February 1989 (1989-02-21) -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/03305

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0371783 A	06-06-1990	JP 2150272 A	08-06-1990
		JP 2777385 B	16-07-1998
		DE 68914412 D	11-05-1994
		DE 68914412 T	25-08-1994
		US 5166067 A	24-11-1992
US 3915802 A	28-10-1975	JP 1313793 C	28-04-1986
		JP 51044691 A	16-04-1976
		JP 60036752 B	22-08-1985
JP 03172170 A	25-07-1991	NONE	
WO 0046354 A	10-08-2000	AU 2970200 A	25-08-2000
WO 8706610 A	05-11-1987	AT 82588 T	15-12-1992
		DE 3782736 A	24-12-1992
		DE 3782736 D	24-12-1992
		DE 3782736 T	09-06-1993
		EP 0302894 A	15-02-1989
		JP 2529321 B	28-08-1996
		JP 1502315 T	17-08-1989
		US 5541105 A	30-07-1996
		US 5631006 A	20-05-1997
US 4806484 A	21-02-1989	NONE	

2

6

2

2

**A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 C12M1/12 C12M3/06

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 371 783 A (HITACHI LTD) 6. Juni 1990 (1990-06-06)	1,2,4,8, 9,13-17, 19-22, 24-27, 35,36
Y	Abbildung 2; Beispiel 5 ---	1-3
Y	US 3 915 802 A (KOMINEK LEO A) 28. Oktober 1975 (1975-10-28) Spalte 4, Absatz 2; Abbildung 1 ---	1-3
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 413 (C-0877), 22. Oktober 1991 (1991-10-22) & JP 03 172170 A (ASAHI MEDICAL CO LTD), 25. Juli 1991 (1991-07-25) Zusammenfassung --- -/--	1,3



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

6. Juli 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/07/2001

 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Coucke, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/03305

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
P,Y	WO 00 46354 A (PROTEIN SCIENCES CORP) 10. August 2000 (2000-08-10) Abbildungen 1,3,9 ---	1-3
X	WO 87 06610 A (ENDOTRONICS INC) 5. November 1987 (1987-11-05) ---	1,3,9, 19,22, 35,37
Y	Seite 6, Zeile 05 -Seite 7, Zeile 20; Abbildung 1; Beispiel 1 ---	1-3
A	US 4 806 484 A (PETROSSIAN ASHOT ET AL) 21. Februar 1989 (1989-02-21) -----	

**INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/03305

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0371783 A	06-06-1990	JP 2150272 A	08-06-1990
		JP 2777385 B	16-07-1998
		DE 68914412 D	11-05-1994
		DE 68914412 T	25-08-1994
		US 5166067 A	24-11-1992
US 3915802 A	28-10-1975	JP 1313793 C	28-04-1986
		JP 51044691 A	16-04-1976
		JP 60036752 B	22-08-1985
JP 03172170 A	25-07-1991	KEINE	
WO 0046354 A	10-08-2000	AU 2970200 A	25-08-2000
WO 8706610 A	05-11-1987	AT 82588 T	15-12-1992
		DE 3782736 A	24-12-1992
		DE 3782736 D	24-12-1992
		DE 3782736 T	09-06-1993
		EP 0302894 A	15-02-1989
		JP 2529321 B	28-08-1996
		JP 1502315 T	17-08-1989
		US 5541105 A	30-07-1996
		US 5631006 A	20-05-1997
US 4806484 A	21-02-1989	KEINE	

2011

2011